

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-269197

(43)Date of publication of application : 02.10.2001

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

G01N 31/22

G01N 33/53

G01N 33/566

G01N 35/02

(21)Application number : 2000-086645 (71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 27.03.2000 (72)Inventor : SEGAWA MASAYA  
TAKARADA YUTAKA

## (54) IMMOBILIZED OLIGONUCLEOTIDE PROBE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a technology for detecting a sequence-specific nucleic acid useful for a biological research and a clinical diagnosis.

SOLUTION: The method for detecting the sequence-specific nucleic acid and a reagent kit for detecting the nucleic acid are characterized by inserting a spacer having  $\leq 10$  nucleotides to a binding site of a hybridization region in a capture probe and a solid support when used as the capture probe by immobilizing oligonucleotide on the solid support.

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-269197

(P2001-269197A)

(43) 公開日 平成13年10月2日 (2001.10.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	7-12-1 (参考)
C 1 2 Q 1/56		C 1 2 Q 1/56	A 2 G 0 4 2
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 31/22	1 2 1 P 2 G 0 5 8
G 0 1 N 31/22	1 2 1	33/53	M 4 B 0 2 4
33/53		33/566	4 B 0 6 3
33/566		35/02	F

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-86645 (P2000-86645)	(71) 出願人	000003109 東洋紡織株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番6号
(22) 出願日	平成12年3月27日 (2000.3.27)	(72) 発明者	成川 昌也 滋賀県大津市鷺田二丁目1番1号 東洋紡 織株式会社総合研究所内
		(73) 発明者	宝田 裕 滋賀県大津市鷺田二丁目1番1号 東洋紡 織株式会社総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固定化オリゴヌクレオチドプローブ

(57) 【要約】

【課題】 生物学的研究や臨床診断などに有用な、配列特異的な核酸検出技術を提供する。

【解決手段】 固相支持体にオリゴヌクレオチドを固定化して捕捉プローブとして使用する様に、捕捉プローブのハイブリダイズ領域と固相支持体結合部に10ヌクレオチド以下のスパーサーを介することを特徴とする配列特異的な核酸検出方法および核酸検出用試薬キット。

特開2001-269187

(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも1種のオリゴヌクレオチドブ  
 ロープが固定化される固体支持体であって、該ブ  
 ロープが検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的  
 な約10〜90塩基のヌクレオチド配列により標識され  
 るハイブリダイズする領域及び検出されるべき前記特定  
 のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができな  
 いスベーパー領域を含んで成り、該スベーパー領域は一  
 般において前記固体支持体に結合し他端において前記ハ  
 イブリダイズする領域に結合してなり、かつ該スベーパー  
 領域が10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなること  
 を特徴とする固体支持体。

【請求項2】 前記スベーパー領域が4〜10塩基のオリ  
 ゴヌクレオチドからなる請求項1記載の固体支持体。

【請求項3】 前記固体支持体がマイクロタイタプレート  
 である請求項1又は2に記載の固体支持体。

【請求項4】 前記プローブがオリゴデオキシリボスク  
 レオチド又はその誘導体である請求項1〜3のいずれか  
 に記載の固体支持体。

【請求項5】 検出されるべき特定のヌクレオチド配列  
 に相補的な約10〜90塩基のヌクレオチド配列により  
 標識されるハイブリダイズする領域を含んでなる反応試  
 薬を有する少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプロー  
 ブを、検出されるべき前記特定のヌクレオチド配列にハ  
 イブリダイズすることができないスベーパー領域を介し  
 て固体支持体に固定化する方法であって、該スベーパー  
 領域が10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなること  
 を特徴とする方法。

【請求項6】 前記固体支持体としてポリカルボキシミ  
 ドがコートされたマイクロタイタプレートを用い、カル  
 ボキシミド基の付加反応により前記プローブの末端と  
 結合せしめる請求項5記載の方法。

【請求項7】 請求項1〜4のいずれかに記載の固体支  
 持体を含んで成ることを特徴とする検出用試薬キット。

【請求項8】 特異的に結合した標的核酸の検出手段を  
 含む請求項7記載の検出用試薬キット。

【請求項9】 以下の工程(a)および(b)を含んで  
 なるサンプル中の核酸配列の存在を検出する方法。

(a) 該サンプルを標的核酸配列のハイブリダイゼー  
 ションを許容する条件下で請求項1〜4のいずれかに記  
 載の固体支持体と接触せしめる

(b) ハイブリダイゼーションが起ったか否かを決定す  
 る

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、核酸化学及び特定  
 の核酸配列の検出に関する。さらに詳しくは、本発明  
 は、核酸プローブを固定化する方法、固定化されたプロ  
 ーブを含んで成る安定な測定試薬、及びこれらの固定化

2

されたプローブを用いて行われるハイブリダイゼーシ  
 オンアッセイに関する。本発明は、臨床診断、疫学、環  
 境生物の環境調査、食料及び薬品の品質保証、並びに分子  
 生物学の研究手法において有用なものである。

【0002】

【従来の技術】 ハイブリダイゼーションアッセイは、あ  
 る特定の配列に相補的な核酸塩基（以下、プローブとも  
 いう）を用いてハイブリダイゼーションによりその配列  
 を検出するものである。ハイブリダイゼーションアッセイ  
 は研究分野では古典的な技術(Current protocols in  
 molecular biology (John Wiley & Sons, Inc.), Molecular  
 cloning 2nd Ed. (Gold Spring Harbor Press))である  
 が、これらの文献に記載されている方法は、検出すべき  
 核酸を含む試料をニトロセルロースメンブラン等に固定  
 化して溶液中の核酸プローブを反応させる。Kalkows  
 kyは、米国特許第4,358,535号において、感度増強のため  
 の特異的DNAプローブの使用を記載しているが、これ  
 らも試料（例えば、血液、細胞、唾液等）をメンブランフ  
 イルター（例えば、ニトロセルロース）上にスポットし、  
 細胞を溶解し、そして核酸を化学変性及び核酸により固  
 定する工程を含んで成る。しかしながら、核酸試料を固  
 定化する操作は面倒であり、多数の試料を検査する臨床  
 診断などには不向きであった。

【0003】 本発明は、逆に核酸プローブを固定化す  
 ることによりこの問題を解決している(Gene, 21:77-8  
 3, 1993)。固定化した配列特異的核酸プローブでハイ  
 ブリダイゼーションにより試料中の特異的核酸を捕捉し、そ  
 れで標識された核酸配列を別のラベルされた配列特異的  
 核酸プローブで検出する。いわゆるサンドイッチハイ  
 ブリダイゼーションアッセイ（特開昭58-40698号  
 公報）である。この方法により、ハイブリダイゼーシ  
 オン反応のみでアッセイが完了し、操作は単純化するので  
 自動化もしやすくなる。さらに、Gmaerasらは、比較的  
 短いオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションプロ  
 ーブとして用いることにより反応時間を短縮できること  
 を報告している(Nucleic Acids Research, 15:5373-539  
 6, 1987)。

【0004】 上記のような手法では、核酸プローブをい  
 かに安定的に固体支持体に結合させるかが問題となる。  
 この結合形式は、塩水溶液などの非共有結合を用いる方  
 法（特開平5-271272号公報）及び共有結合を用いる方  
 法とに大別される。共有結合を用いる方法では、固  
 体支持体にアミノ基を導入し、核酸プローブの末端にリン  
 酸基を生成させて結合させる方法(Analytical Bioche  
 mistry, 198:138-142, 1991)や、ポリカルボキシミド樹  
 脂を散布し、カルボキシミド基を介して核酸に導入した  
 アミノ基や核酸が実装されているアミノ基と結合させる  
 方法（特開平8-23975号公報）などがある。一般に、  
 共有結合を用いる方がより安定した結果と製品の保  
 存性をもちやすいため実用上有利である。

3

【0005】本発明者らは、オリゴヌクレオチドにアミン基を導入し、この特開第8-23975号公報に記載される方法を用いてポリカルボシמידをコートしたポリスチレン製マイクロタイタプレートに結合させて蛍光プローブとする方法を開発してきた。しかしながら、この方法においては、ハイブリダイゼーションの効率が良いという問題があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ハイブリダイゼーションの効率の面で優れた改良ハイブリダイゼーションによる簡便な検出手段を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意検討した結果、固体支持体に結合することによる立体障害がハイブリダイゼーションの効率を低下させていることを見出した。そして、結合部分とプローブのハイブリダイゼーション可能領域をスパーサー領域により離すことによりハイブリダイゼーションの効率を向上させることが可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブが固定化されている固体支持体であって、該プローブが検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10〜60塩基のヌクレオチド配列により形成されるハイブリダイズする領域及び検出されるべき前記特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスパーサー領域を含んで成り、該スパーサー領域は一端において前記固体支持体に結合し他端において前記ハイブリダイズする領域に結合してなり、かつ該スパーサー領域が10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする固体支持体。

(2) 前記スパーサー領域が4〜10塩基のオリゴヌクレオチドからなる(1)の固体支持体。

(3) 前記固体支持体がマイクロタイタプレートである(1)又は(2)の固体支持体。

(4) 前記プローブがオリゴデオキシリボスヌクレオチド又はその誘導体である(1)〜(3)のいずれかの固体支持体。

(5) 検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10〜50塩基のヌクレオチド配列により形成されるハイブリダイズする領域を含んでなる反応容器を有する少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブを、検出されるべき前記特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスパーサー領域を介して固体支持体に固定化する方法であって、該スパーサー領域が10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする方法。

(6) 前記固体支持体としてポリカルボシמידがコー

(3)

特開2001-269197

4

トされたマイクロタイタプレートを用い、カルボシמיד基の付加反応により前記プローブの末端と結合せしめる(5)の方法。

(7) (1)〜(4)のいずれかの固体支持体を含んで成ることを特徴とする検出装置用キット。

(8) 特異的に結合した検出試薬の検出手段を含む(7)の検出装置用キット。

(9) 以下の工程(a)および(b)を含んでなるサンプル中の核酸配列の存在を検出する方法。

(a) 該サンプルを相補的核酸配列のハイブリダイゼーションを許容する条件下で(1)〜(4)のいずれかの固体支持体と接触せしめる  
(b) ハイブリダイゼーションが起ったか否かを決定する

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の理解及び記載を助けるため、次の用語を以下のように定義する。「標識」とは、「ラベル」とは、検出可能な、好ましくは定量可能なシグナルを提供するために使用することができ、そして核酸又は蛋白質に結合させることができる任意の原子又は分子を意味する。上記ラベルは、蛍光、発光、吸光、放射能、電気、質量、酵素活性等により検出することができるシグナルを提供する。適当なラベルとしては蛍光物質、発光物質、放射線原子(例えば<sup>32</sup>P又は<sup>33</sup>P)、電子伝達試薬、酵素、及び特異的結合パートナーを有するリガンドが含まれる。

【0009】酵素を用いる場合は、典型的にはその活性により検出される。例えば、ペルオキシダーゼ(以下、HRPとも示す)はジアミンベンジジンなどを用光化学計によって定量化できる青色色素に変換するその能力によって検出することができる。同一のラベルが複数の異なる検出手段によって検出することができる。上記の記載は種々のラベルを別個のクラスに分類することを意味するものではない。例えば、<sup>33</sup>Pは放射線ラベルとして又は電子密度として検出することができる。HRPは酵素として、又は抗体例えばモノクローナル抗体(MAb)に対する抗原として検出することができる。さらに、所望の効率のために種々のラベルを組み合わせたことができる。例えば、MAb及びアビジンをラベルして本発明の実施のために用いることができる。プローブをビーズによりラベルし、そしてその存在を<sup>33</sup>Pによりラベルされたアビジンにより検出し、さらにHRPでラベルされた抗ビーズMAbにより検出することができる。あるいは、dsDNA(又はハイブリダイズしたRNA)に対するラベルされたMAbを用い、そして標識をラベルすることなくハイブリダイゼーションの存在を直接検出することができる。それ以外の標識についても可能であり、上記の標識に限定されるものではない。

【0010】「オリゴヌクレオチド」とは、2個以上のデオキシリボスヌクレオチド又はリボスヌクレオチドから成

50

特開2001-269197

(4)

5

る分子である。オリゴヌクレオチドまたはスクレオチド断片、例えばホスホリボース及びアルキルホスホリボース、並びに誘導体化されたすなわち、ラベルされたオリゴヌクレオチドを含むことができる。人工的に合成したオリゴヌクレオチドはプライマー、プローブ、検出試薬及びホストのフュージングオリゴマーなどに使用し、オリゴヌクレオチドのサイズは最終的な機能又は用途に依存する。

【0011】「グループ」とは、目的物を検出あるいは定量するための構造や分子である。当該分野では、検出対象の核酸配列とハイブリダイズによって特異的に結合する構造あるいは固定化された核酸分子、すなわち「核酸プローブ」を指すことが多い。本発明においても、単に「プローブ」と表現している場合も全て「核酸プローブ」を指している。核酸プローブには、天然の核酸分子を模倣あるいは固定化したものか人工的に合成した核酸分子(オリゴヌクレオチド)を模倣あるいは固定化したものがある。核酸分子は、好ましくは単鎖であるが、二本鎖であってもよい。二本鎖である場合には、通常はハイブリダイズに使用する側とその鎖を分離するために熱変性したものをを用いる。本発明においては、人工的に合成したオリゴヌクレオチドをプローブに使用している。プローブはハイブリダイズするために十分に短くなければならないが、長すぎる逆に非特異的反応を誘発するので好ましくない。したがって、適当な長さはハイブリダイゼーション反応条件など多くの因子に依存して決定される。

【0012】「配列特異的ハイブリダイゼーション」は、ハイブリダイゼーションが起こるためにプローブとサンプル核酸の配列との間の正確な相補性が要求される厳格なハイブリダイゼーション条件であることを意味する。この条件は通常非常に容易に認識され、そしてプローブの長さ(長さ)及び塩基組成に依存する。一般に、正確な一致が存在しない場合にプローブが実験的にハイブリダイズしない条件を得るために、ハイブリダイゼーション溶液の温度、pH、イオン強度、及びカチオン性染料(cholesterol)の濃度などのハイブリダイゼーション条件を変えるか、プローブの塩基組成もそのものを変化する。結合したDNAへのプローブのハイブリダイゼーションのため、標準的条件(0.9M NaCl)下では過塩素酸を指定するための実験式として、 $T_m(°C) = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T+U)$

5 が知られている。ここでG、C、A及びTは、それぞれグループ中のG(グアニン)、C(シトシン)、A(アデニン)及びT(チミン)塩基の数を表わす。Melnikova, 1984, *Analyt. Biochem.*, 138:267-284)。もっとも、出願者はこの数式は単に最適温度についておよその値を与えるに過ぎず、真の最適温度を得るためには実験的に検証されるべきであることを認識している。塩濃

度は2×SSC程度、温度は50℃程度のハイブリダイゼーション条件では、1塩基の相違でも識別できる核酸プローブとして用いる場合、 $20 \times 30 \times$ ヌクレオチドの領域を有していることが好ましい。

【0013】本発明は、検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10〜50塩基のヌクレオチド配列により構成されるハイブリダイズする領域を含んでなる反応性基を有する少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブを、検出されるべき特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスベーパー領域を有して固体支持体に固定化する方法である。本発明においては、該スベーパー領域を構成するオリゴヌクレオチドは10塩基以下であることを特徴とする。好ましくは4〜10塩基、さらに好ましくは4〜6塩基である。

【0014】固定化プローブにスベーパーを導入する方法は、特許第289789号公報にも開示されている。しかしながら、ここに記載されている方法では20〜80塩基、少なくとも10塩基以上の長さのオリゴヌクレオチドからなるスベーパー領域を必要としている。短い塩基からなる核酸を結合させるのはコストが高くなるだけでなく、収量や純度も著しく低下する。そのため、合成後に選別させるなどの工夫がなされているが、製造工程が複雑になる。これに対し、本発明の方法ではスベーパーはわずか10塩基以内で十分である。この程度ならばプローブ用オリゴヌクレオチドの化学合成の後に付加しても大したコスト増にはならず、プローブの製造工程はスベーパーがない場合とあまり変わらない。すなわち、合成の際にハイブリダイズする領域の残あるいは後にスベーパーの配列を付加するのである。検出の結果、スベーパーの付加によってハイブリダイゼーションの効率には明らかに向上するが、多くの場合4〜10塩基で効率にはほぼ同じであった。よって、本発明のスベーパーは10塩基で十分と考えられる。本発明におけるスベーパーの配列についても検討している。その結果、ハイブリダイズする領域に全く影響がない配列であれば、どのような配列でも問題がないことが判明した。実際の適用においては、特に問題がない限りオリゴヌクレオチド合成試薬のコストなどの理由によりpolyT配列をスベーパーとして使用している。

【0015】本発明における固体支持体との結合様式についても検討している。本発明者らは、水相結合などの非共有結合による方法でも同様の効果を確認している。例えば、アルカリ性の緩衝液(pH 10程度)を用いて、アミノリカーを有するオリゴヌクレオチドを高親水性のマイクロタイタレーションに水相結合で固定化することができるが、その場合も「束縛」のリカー部とハイブリダイズ領域との間スベーパー領域を付加することにより、ハイブリダイゼーションの効率は明らかに向上した。やはりヌクレオチド間で効果はほぼ大抵に達しており、共有結合の場合と同じ傾向を示した。固体支持体と

(5)

特開2001-269197

7

の結合部分が明確であるならば、本発明の導線は結合の方式に関わらず発明されるものである。

【01016】さらに本発明は、少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブ（以下、単にプローブともいう）が固定化されてなる固体支持体であって、該プローブが検出されるべき特定のヌクレオチド配列に相補的な約10〜60塩基のヌクレオチド配列により標識されるハイブリダイズする領域及び検出されるべき標記特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができないスパーサー領域を含んで成り、該スパーサー領域は一集において標記固体支持体に結合し能態において標記ハイブリダイズする領域に結合してなり、かつ該スパーサー領域が10塩基以下、好ましくは4〜10塩基、さらに好ましくは4〜6塩基のオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする固体支持体である。

【01017】さらに本発明は、上記固体支持体を含むことを特徴とする検出用試薬キット、特にスパーサーアームを介して共有結合したオリゴヌクレオチドを有する固体支持体を含む安定な検出用試薬キットに関する。さらに特異的に結合した標的核酸の検出手法を含むことが好ましい。上記特異的に結合した標的核酸の検出手法とは、例えばラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、酵素など、標的核酸に関連あるいは直接結合した標識、あるいは標識されたオリゴヌクレオチドからなる検出プローブをいうものである。標識の結合様式としては、標的核酸上の固体支持体に固定化したプローブ（縮短プローブ）と標的核酸にハイブリダイズするプローブを標識する方法（いわゆるサンドイッチハイブリダイゼーション）や、核酸増幅の際に標識プライマーや標識モノヌクレオチドを取り込ませて標的核酸を直接標識する方法などがある。また、抗体と抗原、ヒオチンとアビジンなどの結合を介してハイブリダイゼーション後に標識する方法もある。該検出用試薬キットは臨床診断、法医学、微生物の検出検査、食料及び製品の品質保証、並びに分子生物学の研究手法等に広く応用される。

【01018】本発明は固体支持体に結合した縮短プローブの形態に関するものであり、検出手法は特に制限されない。また、固体支持体に結合した縮短プローブにハイブリダイズする標的核酸が直接標識されていてもよい（特開昭92-265999号公報）。また、標記サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイのように、縮短プローブに結合した標的核酸を検出するための標識された検出プローブを用いてもよい（特開昭58-40099号公報）。放線菌として、放射線同位体、蛍光物質、電子標識、酵素などが挙げられ、アビジン/ヒオチン結合や抗体等あるいはヒオチン-カレラー等を用いた間接標識でもよいことはいふまでもない。

【01019】また、固体支持体の材質、形状等について特に制限されるものではないが、アッセイの容易さの

点からはマイクロタイプレートを用いるのが好ましい。該マイクロタイプレートの材質は特に限定されないが、好ましくはポリスチレン製である。また、該マイクロタイプレートの形状としては最も一般的なもの6穴のプレートが挙げられるが、その1列分もしくは1行分に相当する8穴もしくは12穴を有しているストリップ状のものも含まれる。さらに、専用装置の備付に伴い、固体支持体がそれに互換した材質であっても、あるいは特殊な形状を有していても本質的に何の制限もない。例えば、ガラス製もしくはプラスチック製の板状の固体支持体を用いて、異なる複数のプローブを固相化するための個別の領域を有する安定な固体支持体（いわゆるDNAチップ）への応用は容易に類推できるところである。これらへの使用が物理的方式を改良し、そしてハイブリダイゼーション及び検出の信頼性、経済性を増進せしめる。

【01020】本発明の重要な観点とは、固体支持体に結合させるオリゴヌクレオチドプローブの構造に関して、大量生産に特に適しており、そして最大のプローブの持続性及びハイブリダイゼーション効率を可能にする方法を提供したことにある。本発明は共有結合による結合の永久性のため、固定化されたプローブの調製とそれらの使用とを時間的に分けることができ、必要に応じて試験サンプル中の標的核酸配列を迅速に検出する方法に使用することができるとき安定な検出試薬、すなわちハイブリダイゼーション検出固体支持体の調製が可能となる。固体支持体とプローブとの間にスパーサー領域を介することにより、ハイブリダイゼーションの効率は大きく促進されそして改良される。

【01021】

【実施例】以下に、本発明の実施例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとする。なお、実施例により本発明が特に限定されるものではない。

【01022】実施例1 アミノリンカー-オリゴヌクレオチドの合成と固定化

アミノリンカーアームを有するオリゴヌクレオチドを合成し、ポリカルボキシイミドをコードしたポリスチレン製マイクロタイプレート内面に結合させて縮短プローブとした。この際、本発明のスパーサー領域を導入して比較検討の試料とした。

【01023】（1）アミノリンカーアームを有する縮短プローブ用オリゴヌクレオチドの合成

パーキンエルマー装置DNAシンセサイザー392型を用いて、本所ホスファイトにて、記列表・配列番号1に示される配列を有するオリゴヌクレオチド（下位型核酸アイコバクテリウム・ツベルクルシス（Mycobacterium tuberculosis）16S rRNA遺伝子検出用縮短プローブ（以下、縮短プローブと呼ぶ）用オリゴヌクレオチド）を合成した。この際、表記60-5-010717

9

号公報に記載される合成法によりデオキシウリジンから化学合成により調製した、5位にアミノリンカーアームを有するウリジンを、上記オリゴヌクレオチドに導入した。このウリジンはオリゴヌクレオチド内の任意のT残基を置換しうるが、ここでは「末端に付加し、更にスベキ5'-X ACATGCATCC CGTGGTCTA-3'

5'-X TTTT ACATGCATCC CGTGGTCTA-3'

5'-X TTTT ACATGCATCC CGTGGTCTA-3'

5'-X TTTTTTTTTT ACATGCATCC CGTGGTCTA-3'

5'-X TTTTTTTTTTTTTT ACATGCATCC CGTGGTCTA-3'

(X:アミノリンカーアームを有するウリジン)

【0025】合成されたリンカーオリゴヌクレオチドはアンモニア水で50℃、一夜脱保護処理を施した後、ファルマシア社製FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。

【0026】(2)ホリカルボジミドコートプレート内面への結合

ホリカルボジミドをコートしたポリスチレン製マイクロタイタプレート(NSプレートDN;白溝紡績株式会社)内面に、(1)で合成した各種アミノリンカーオリゴヌクレオチドをそれぞれ結合させた(特開平8-23975号公報)。固体支持体のカルボジミド基とオリゴヌクレオチドのアミノ基が反応し、共有結合する。まず2M NaCl濃度中にアミノリンカーオリゴヌクレオチドを5mMの濃度で加え、200μlずつNSプレートDNに分注した。そのまき37℃で1時間反応し、蒸留水で洗浄した。得られた確率プローブ結合プレートは、真空乾燥させた状態で凍結保存した。

【0027】実施例2 直接標識法精製における本発明用確率プローブの性能評価

確率プローブに標識的な酵素標識オリゴヌクレオチドを合成し、これを標的として検出することにより、本発明用確率プローブの性能を評価した。

【0028】(1)アミノリンカーアームを有するオリゴヌクレオチドの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列表・配列番号2に示される塩基のオリゴヌクレオチド(確率プローブ)を用いオリゴヌクレオチドを合成した。この際、特表昭60-560717号公報に記載される合成法によりデオキシウリジンから化学合成により調製した、5位にアミノリンカーアームを有するウリジンを、上記オリゴヌクレオチドに導入した。このアミノリンカーアームを有するウリジンはオリゴヌクレオチド内の任意のT残基を置換しうるが、ここでは「末端のT残基と置換した。合成されたリンカーオリゴヌクレオチドはアンモニア水で50℃、一夜脱保護処理を施した後、ファルマシア製

(6)

特開2001-269187

10

★ユーザーとしてT残基を以下に示すように、各0、4、5、10、15塩基付加したものを合成した。

【0024】

【表1】

スベーター：なし

スベーター：4塩基

スベーター：5塩基

スベーター：10塩基

スベーター：15塩基

FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。

【0029】(2)酵素(アルカリ性ホスファターゼ)によるオリゴヌクレオチドの標識

上記(1)で合成した確率プローブ標的オリゴヌクレオチドについて、そのアミノリンカーアームを介してのアルカリ性ホスファターゼ(以下、ALPともいう)との結合を、文献(Nucleic Acids Res.; 第14巻、第6115頁、1986年)に従って行った。リンカーオリゴヌクレオチド(OD260=1.5)を0.2M NaHCO<sub>3</sub>12.5μMに溶解し、ここへ10mMスベリン酸ジスチルニジル(DSS)2.6μMを加えて室温で2分間反応させた。反応液を1mM CH<sub>3</sub>COONa(pH5.0)で平衡化したSephadex G-25(ファルマシア社)カラム(1cmφ×30cm)でゲル浸透して過剰のDSSを除去した。末端のアミノ基が活性化されたリンカーオリゴヌクレオチドを、更にモル比で2倍量のアルカリ性ホスファターゼ(ペリンガーマンハイム製)を100μM NaHCO<sub>3</sub>、3M NaClに溶解したもの(その)と室温で16時間反応させることでアルカリ性ホスファターゼ標識オリゴヌクレオチドを得た。得られた標識オリゴヌクレオチドは、ファルマシア社製FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。標識オリゴヌクレオチドを含む成分を集め、セントリコン30K(アモシ社製)を用いて限外濾過法により濃縮した。これを確率プローブ標的オリゴヌクレオチドとして用いる。

【0030】(3)マイクロタイタプレート中でのハイブリダイゼーション

上記(2)のALP標識した確率プローブ標的オリゴヌクレオチドを各1.0、1.5mM/μlの濃度で含む、あるいはこれを加えない5×SSC(pH7.0)、0.1%スクラフAG(日本精化株式会社)、0.5%PVF、1.0mMβ-GE、1mM2-CA、0.1%NaN<sub>3</sub>の濃度100μLを含む標識プローブ結合プレートに投入し、蒸発を防ぐため流動パラフィンを塗布して50℃で30分孵育させた(それぞれ、100、100、0.05μl/assay)。その後、2×SSC(pH7.0)、0.1

(7)

特開2001-269197

11

%スクラップAGに置換し、50℃で10分保温、さらに1×SSCに置換して洗浄した。洗浄液を排出後、ALPの発光基質であるLumiphos 480(Lumigen製)100μlを注入し、37℃で15分保温後に暗室中でホトカウンタ（炭化ホトキス社製）で発光量（発光シグナル）を測定した。これらの工程は全てDNAプロトタイプ測定システム（日本臨床検査自動化学会誌；第20巻、第728頁、1995年）により自動で行われ、所要時間は約1時間である。上記発光シグナルの強さがハイブリダイゼーション反応の強さを示している。

【0031】（4）結果

標記プローブのスペーサーがない（0塩基）場合に比べ、本

改良実施例

標記 fmo/assay	0	4	5	10	15
100C	49,791	117,856	184,240	118,755	117,495
10	4,186	11,419	12,914	12,415	11,524
blank	48	82	85	44	46

単位：cps(count/second)

測定結果：3重复測定の平均

【0033】実施例3 サンドイッチハイブリダイゼーションにおける本発明標記プローブの性能評価  
標記プローブ及び標記プローブに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをサンドイッチハイブリダイゼーションの標的として検出することにより本発明標記プローブの性能を評価した。

【0034】（1）オリゴヌクレオチドの合成

パーキンエルマー社DNAシネサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列表・配列番号3に示される配列を有するオリゴヌクレオチド（ヒト鋳模鎖）16S rRNA遺伝子抽出標記プローブ（以下、標記プローブと呼ぶ）用オリゴヌクレオチド及び配列表・配列番号4に示される配列を有するオリゴヌクレオチド（サンドイッチハイブリダイゼーション標的オリゴヌクレオチド（以下、標的オリゴヌクレオチドと呼ぶ））を合成した。標記プローブ用オリゴヌクレオチドを合成する際、特許第819-500717号公報に開示された合成法によりデオキシリボリンから化学合成により調製した、5'位にアミノリボリンアームを有するオリグジンを、配列表・配列番号3に記載のオリゴヌクレオチドに導入した。このオリグジンはオリゴヌクレオチド内の任意の下核基を置換しうるが、ここでは5'末端から11番目の下核基を置換した。合成されたオリゴヌクレオチドは、いずれもアンモニア水で、50℃、一夜脱塩処理を施した後、フルマシア製FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。

【0035】（2）アルカリ性ホスファターゼによるオリゴヌクレオチドの標記

上記（1）で合成した標記プローブ用オリゴヌクレオチドについて、そのアミノリボリンアームを介したALP

\*4塩基以上ある場合は2倍以上の発光シグナルを示している。100 fmo/assay、10 fmo/assayのどちらにも同じような比率で向上していることから、結合している標記プローブの純量（キヤパシティ）などが変化したのではなく、スペーサーの付加によってハイブリダイゼーション効率自体が向上したものと考えられる。また4塩基から15塩基までではあまり変化がないことから、本発明においてスペーサーは4塩基で十分ということになる。本結果により、本発明のスペーサーの効果が高度

【0032】

【表1】

との結合を、文獻（Nucleic Acids Research; 第14巻、第115頁、1986年）の記載に従って行った。リンカーオリゴヌクレオチド（OD200=1.5%）を、0.2M NaHCO<sub>3</sub>、12.5 μlに溶解し、ここへ1.0 μl of 0.1M スペイン酸スチルベンニミジ（DS）25 μlを加えて室温で2分間反応させた。反応液を1mM CH<sub>3</sub>COONa（pH5.0）で平衡化したSephadex G-25（ファルマシア製）カラム（1cm×30cm）でゲル濾過して過剰のDSを除去した。末端のアミノ基が活性化されたリンカーオリゴヌクレオチドを、更にモル比で2倍量のアルカリ性ホスファターゼ（ペーリンガーマンハイム製）を100mM NaHCO<sub>3</sub>、3M NaClに溶解したものに室温で16時間反応させることでALP標記オリゴヌクレオチドを得た。得られた標記オリゴヌクレオチドは、フルマシア製FPLCで陰イオン交換カラムを用いて精製した。標記オリゴヌクレオチドを含む溶液を、セトリコン30K（アモコン製）を用いて膜外濾過により濃縮した。これをサンドイッチハイブリダイゼーションの標記プローブとして用いる。

【0036】（3）マイクロタイタープレート中でのサンドイッチハイブリダイゼーション  
標的オリゴヌクレオチドを5 μl、1 fmo/μlの濃度で含む水溶液あるいは単なる純水（ブランク用）を等量の0.6N NaOHと混合して変性させ、高純度で10 μlを200 μM クエン酸-リン酸緩衝液（pH6.0）、2%スクラップAG（日本精化株式会社製）、7.5 mM NaCl、0.1% NaN<sub>3</sub>の濃度80 μlと混合して速やかに実施例1の標記プローブ内に注入し、蒸発を防ぐための密封パラフィルムを施して50℃で30分間 incubate させた。100、10、0 fmo/assay、こ



33

の反応によって標的オリゴヌクレオチドは捕捉プローブに捕捉される。

【0037】次に、上記(2)の標的プローブを10 fmol/ $\mu$ lの濃度で含む5×SSC(pH7.0)、0.1%スクラップAG、0.5% PVP、1.0 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ZnCl<sub>2</sub>、0.1% Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>の溶液100  $\mu$ lに置換し、同様に発光を防ぐため熱動平衡を重複して、50℃で30分振盪させた。これによって、捕捉された標的オリゴヌクレオチドに標的プローブが特異的に結合する。その後、2×SSC(pH7.0)、0.1%スクラップAGに置換し、50℃で10分振盪。さらに1×SSCに置換し洗浄した。洗浄液抽出後、ALPの発光基質であるluciphos 460(Ludigen製)100  $\mu$ lを投入し、37℃で15分振盪後に暗室中でホトンカウンター(浜松ホトニクス製)で発光量(発光シグナル)を測定した。これらの工程はすべて、DNAプローブ自動測定システム(日本臨床検査自動化学会誌;第20巻、第728頁、1999年)により自動で行われ、所要時間は約2時間である。上記発光シグナルの根本サンディッチハイブリダイゼーション

検体	検出プローブのスペーサー長(塩基)				
	0	4	5	10	15
100	17,949	52,185	51,045	52,181	49,210
10	1,810	4,676	5,200	5,105	5,024
Blank	71	68	56	69	70

単位: cps(count/second)

測定結果: 3 重測定 の平均

【0040】

【発明の効果】上述したように、本発明においては、10塩基以下のオリゴヌクレオチドからなるスペーサーを用いてプローブを固体支持体に固定化することにより、極めて安価に固体支持体上の固定化プローブのハイブリダイゼーション効率を向上させることが可能となす。

配列番号: 1

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 両鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 塩の配列 合成DNA

配列の特徴

存在位置: 1..20

特徴を決定した方法: S

他の特徴: ヒト型結核菌マイコバクテリウム・ツベルクルシス (Mycobacterium tuberculosis) 25S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する。

配列

ACATGATCAT GGTCTCTCTA

【0042】

配列番号: 2

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

(9)

特開2001-269197

14

\*がハイブリダイゼーション反応の強さを示している。

【0038】(4) 結果

捕捉プローブのスペーサーがない(0塩基)場合に比べ、4塩基以上ある場合はおよそ3倍の発光シグナルを示している。直接標的検出の場合と同様、100 fmol/assay、10 fmol/assayのどちらも同じような比率で向上していることから、結合している捕捉プローブの総量(キャパシティ)などが変化していたのではなく、スペーサーの付加によってハイブリダイゼーション効率そのものが向上したと考えられる。また、4塩基から15塩基まであまり変化がないことから、本検出系においてはスペーサーの長さは4塩基あれば十分ということになる。実施例2の直接標的検出における検出の場合と同様に非常に相違していることから、捕捉プローブによる標的工程のハイブリダイゼーション効率が向上したことが強く示唆される。本結果により、本発明のスペーサーの効果が高げられた。

【0039】

【表2】

※た、また本発明は、臨検診断や生物学的研究に広く用いられているハイブリダイゼーション反応の改良技術として極めて有効であり、これらの改良技術を用いた各種試験やキット等の開発に大きく寄与するものである。

【0041】

【配列表】

20

	15	(9)	特開 2001-269187
	鎖の数：両形鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸 合成DNA 配列の特徴 存在位置：1..20 特徴を決定した方法：5 他の特徴：ヒト結核菌 ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) 16S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する。 配列 TAGGACCAGC GGATGCATGT		16
[0043]			20
	配列番号：3 配列の長さ：18 配列の型：核酸 鎖の数：両形鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸 合成DNA 配列の特徴 存在位置：1..18 特徴を決定した方法：5 他の特徴：ヒト結核菌 ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) 16S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する。 配列 CCGACCGGC TAAAGGCG		20
[0044]			18
	配列番号：4 配列の長さ：39 配列の型：核酸 鎖の数：両形鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸 合成DNA 配列の特徴 存在位置：1..38 特徴を決定した方法：5 他の特徴：ヒト結核菌 ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) 16S rRNA遺伝子の配列と相補的な配列を有する。 配列 TAGGACCAGC GGATGCATGT TACCCCTTAG GCGTGTGG		39

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup> G 01 N 35/02	識別記号	F i C 12 N 15/00	キーワード(参考) Z N A A
---	------	---------------------	----------------------

(10)

特開2001-269197

フォーム(番号) 20042 AA01 BD12 BC20 CB03 DAA2E  
 FB05 HAA07  
 20058 AA09 CC09 EA11 GA01  
 4B024 AA01 AA11 CA01 HA02  
 4B063 QA01 QA08 QA42 QB32 GR35  
 QR55 QR63 QR84 Q603 Q634  
 QK02